

**(54) BIOCHEMICAL PREPARATION OF OPTICALLY ACTIVE
 α -CYANO-3-PHENOXYBENZYL ALCOHOL**

(11) 59-130189 (A) (43) 26.7.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-2603 (22) 10.1.1983
 (71) SUMITOMO KAGAKU KOGYO K.K. (72) MASARU MITSUTA(1)
 (51) Int. Cl.³. C12P7/62, C07C120/00, C07C121/75

PURPOSE: To prepare the titled compound useful as a component of an insecticide, pyrethroid, by the asymmetric hydrolysis with an esterase produced by a specific microorganism.

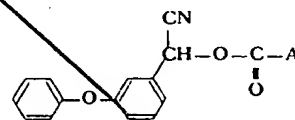
CONSTITUTION: The esterase produced by a microbial strain capable of conducting asymmetric hydrolysis of the half ester of (R, S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol and a 2~5C saturated or unsaturated dicarboxylic acid (which may be substituted with alkyl or halogen), and belonging to *Arthrobacter* genus, *Chromobacterium* genus, *Rhodotorula* genus, etc., e.g. *Arthrobacter simplex* IFO 3530, etc., is made to contact with said half ester at ≤ 7 pH, preferably 3.5~6.5pH to effect the asymmetric hydrolysis of the ester and to resolve the racemic ester into the ester of an optically active α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol rich in (S)-isomer and the ester of its antipode.

**(54) BIOCHEMICAL PREPARATION OF OPTICALLY ACTIVE
 α -CYANO-3-PHENOXYBENZYL ALCOHOL**

(11) 59-130190 (A) (43) 26.7.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-2604 (22) 10.1.1983
 (71) SUMITOMO KAGAKU KOGYO K.K. (72) MASARU MITSUTA(1)
 (51) Int. Cl.³. C12P7/62, C07C120/00, C07C121/75

PURPOSE: To prepare the titled compound useful as a component of an insecticide, pyrethroid, by the asymmetric hydrolysis with an esterase produced by a specific microorganism or derived from animal organs.

CONSTITUTION: The esterase produced by a microbial strain capable of conducting preferential asymmetric hydrolysis of the ester of (S)-alcohol when made to contact with the ester of (R, S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol of formula (A is 1~4C halogen-substituted alkyl, alkenyl or alkynyl), e.g. *Arthrobacter simplex* IFO 3530, or the esterase derived from animal organs, is made to contact with the ester of said (R, S)-compound at ≤ 7 pH, preferably 3.5~6.5pH to resolve the racemic mixture into the ester of an optically active α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol rich in (S)-isomer and the ester of its antipode.



(54) PREPARATION OF LIPID HAVING HIGH γ -LINOLEIC ACID CONTENT

(11) 59-130191 (A) (43) 26.7.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-3196 (22) 12.1.1983
 (71) KOGYO GIJUTSUIN (JAPAN) (72) TOSHIHIRO YOKOCHI(2)
 (51) Int. Cl.³. C12P7/64, C12R1/645

PURPOSE: To obtain a lipid having high γ -linoleic acid content, by culturing a microbial strain belonging to *Mortierella* genus.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to *Mortierella* genus and selected from *Mortierella vinacea* IFO 6738, *Mortierella ramanniana* var. *anglispora* IFO 8187 and *Mortierella nana* IFO 8794, is inoculated in a medium containing a hydrocarbon such as kerosene, n-decane, etc. as a carbon source, and cultured under aerobic condition at 4.0~6.0pH and 10~33°C for 5~30 days. The objective lipid having high γ -linoleic acid content can be separated from the cultured microbial cells.

BEST AVAILABLE COPY

① 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

② 公開特許公報 (A)

昭59—130191

⑤ Int. Cl.³
C 12 P 7/64
// (C 12 P 7/64
C 12 R 1/645)

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

④ 公開 昭和59年(1984)7月26日

発明の数 1
審査請求 有

(全 3 頁)

⑤ γ-リノレン酸含量の高い脂質の製造方法

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目
1番地化学技術研究所内

② 特 願 昭58—3196

⑦ 発 明 者 中里敏

② 出 願 昭58(1983)1月12日

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目
1番地化学技術研究所内

⑦ 発 明 者 横地俊弘

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目
1番地化学技術研究所内

⑧ 出 願 人 工業技術院長

⑨ 指定代理人 工業技術院化学技術研究所長

⑦ 発 明 者 鈴木修

明 細 書

1. 発明の名称

γ-リノレン酸含量の高い脂質の製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) モルティエラ属に属するピナセア、ラマニアナ、アングリスボラ及びバナナの中から選ばれる菌株を炭化水素を炭素源とする培地に培養し、培養物よりγ-リノレン酸含量の高い脂質を採取することを特徴とする脂質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はモルティエラ属の糸状菌を炭化水素を炭素源とする培地に培養し、培養物よりγ-リノレン酸含量の高い脂質(中性脂質(油脂など)、極性脂質(リン脂質、糖脂質))を製造する方法に関するものである。

現在までに報告されているγ-リノレン酸を含む微生物としてはムユール・グロボサス(全脂肪酸に対するγ-リノレン酸含量: 中性脂質12.3%、極性脂質25.7%、以下、単に中性脂質と極性脂質の



量を示す)、ムユール・ブシルス(中性脂質1.5%、極性脂質1.4%)(R. O. Mumma et al., Lipids, 6, 584 (1971))、ユアネホラ・ククリビタルム(全脂質10.8%)(H. B. White, Jr., S. S. Rowell, Biochim. Biophys. Acta, 116, 388 (1966))、ビチウム・テバリアナム(全脂質4.5%)、サブプロレグニア・リトラリス(全脂質2.8%)、リゾバス・ストロニファ(全脂質15.6%)、リゾバス・アルヒザス(全脂質9.8%)、ピュミセス・ブラケエスレアスス(全脂質5.4%)、ムユール・ジャバニカス(全脂質13.7%)、ヘリユステイルム・ビリホルメ(全脂質8.5%)(R. Shaw, Biochim. Biophys. Acta, 98, 230 (1965))、エントモフトラ・コロナタ(全脂質2.2%)(R. O. Mumma, T. E. Bruszewski, Lipids, 5, 915 (1970))等が知られているが、これらはいずれも炭素源が炭水化物であり、含量も極性脂質で一部高い値が出ているが、全脂質でのγ-リノレン酸含量は多くて10数%に過ぎない。

本発明は γ -リノレン酸含量の高い脂質を生産する糸状菌について研究した結果、モルティエラ属に属する特定の糸状菌が炭化物を炭素源とした培地では、窒素源濃度、培養温度等を変えて培養を行つても、菌体内の全脂肪酸中に含まれる γ -リノレン酸の含量が一般には5%以下であり、多くて10%程度あつたのに対して、炭化水素を炭素源とした培地で培養した菌体では、 γ -リノレン酸含量が一般的に全脂質の脂肪酸組成の23%以上、極性脂質では40%という高い値に達する脂質を生産することを見出し、本発明は完成するに至つた。

すなわち、本発明はモルティエラ属に属する特定の糸状菌を炭化水素を炭素源とする培地に培養し、培養物により γ -リノレン酸含量の高い脂質(中性脂質(油脂など)、極性脂質(リン脂質、糖脂質))を製造する方法である。

本発明の使用菌は、モルティエラ(Mortierella)属のビナセア(vinacea)(IFO. 6738)ラマニア・アングリスボラ(ramanniana var.

anglisporea)(IFO. 8187)、ナナ(nana)(IFO. 8794)の各種菌株である。

なお、上記した菌はいずれも財団法人発酵研究所に保存され、IFOカタログ(菌株目録)に記載されている糸状菌である。

上記糸状菌を培養する培地の炭素源である炭化水素としては、例えばケロセン(n -デカン80%含有)、 n -アルカン($C_{10} \sim C_{15}$)、 n -デカン、ウンデカン、ヘキサデカン、ペンタデカンなどが用いられる。炭化水素は培地1ℓ中に10~30ml用いるのが好ましい。また窒素源としては、例えば NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ などのような無機窒素源、または尿素、ペプトン、酵母エキス、コーン・ステープ、リカーなどの有機窒素源が用いられる。無機塩としては、例えば KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $NaCl$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ などが用いられる。その他必要に応じて微量要素、その他の栄養源を添加する。

上記糸状菌の培養は通常液体培地で静置培養、振とう培養、通気攪拌培養などにより行われる。

培地のpHは4.0~6.0が良く、通常10~33℃で5日~30日培養が行われる。かくして、培養物中に γ -リノレン酸含量の高い脂質が生産されるので、培養物から脂質を採取する脂質の採取にあつては、脂質が糸状菌の菌体中に含まれるので、培養物より菌体を分離し、この菌体より脂質を採取するのが好適である。脂質の採取は常法に従つて例えば溶媒抽出などによつて行われる。

かくして、本発明によれば、炭化水素を炭素源として γ -リノレン酸含量の高い脂質を生成することが可能になる。 γ -リノレン酸(18:3(6,9,12))はリノール酸と共に哺乳動物では体内で合成することのできない、食飼として要求される脂肪酸(必須脂肪酸)である。これは γ -リノレン酸が体内でビスホモ γ -リノレン酸となり、さらにはアラキドン酸となる前駆体であること、ビスホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸はそれぞれプロスタグランジン、 E_1 、 $E_{1\alpha}$ 及び E_2 、 $E_{2\alpha}$ となり生体中で極めて重要な生理的な役割をはたしているからである。植物種子などから生産される

γ -リノレン酸は α -リノレン酸(18:3(9,12,15))が大部分を占めており、 γ -リノレン酸を生産するものは少なく、この意味で γ -リノレン酸含量の多い脂質の生産は γ -リノレン酸の生産という意味においても重要な意義を持つている。

次に本発明の実施例を示すが、本発明はこれにより制限を受けるものではない。

実施例1

n -デカン 12.5 ml、 KH_2PO_4 2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g、 $NaCl$ 0.1 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 mg、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.0 mg、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.2 mg、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 mg、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.0 mg、Thiamine-HCl 2 mg、D-Biotin 0.02 mgと窒素源として NH_4NO_3 0.91 g、(C/N比(n -デカン中の炭素原子重量/窒素源中の窒素原子重量)は24.1)を脱イオン水1000mlに混合し、pHを4.6に調整した。この合成培地400mlを1ℓの三角フラスコに入れ、それぞれ菌株を接種し、所定の温度で所定の期間150rpmで振とう培養を行つた。培養後、ろ過法あるいは遠心分

法で菌体を集めた。その一部を含水率の定数の為、精秤し、恒温槽中120℃で一昼夜乾燥し、含水率を求め、残りの菌体について脂質の抽出を行った。菌体からの脂質の抽出は、残り菌体にクロロホルム-メタノール(2:1 v/v)混液を加え、ガラスビーズ存在下にホモジナイズすることにより菌体の破砕と脂質の抽出を同時に行つた。なお、抽出を完全に行うため、これを5回繰返し、全抽出液を集めた。上記抽出液をFlochの分配洗浄法により精製した後、溶媒を減圧留去し、重量法で全脂質量を測定した。

菌体から抽出し、精秤した生成脂質は一部を取りメチルエステル化の後、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を分析した。残りの脂質について、ユニシルを充填剤とし、クロロホルム及びメタノールを展開溶剤とするカラムクロマトグラフィーにより中性脂質と極性脂質に分離し、それぞれの存在量を求めると共に、それぞれの脂質についてもガスクロマトグラフィーを行い、脂肪酸組成を求めた。このような方法により求めた各種

ルティエレラ属糸状菌の脂質生成量と γ -リノレン酸含量を次表に示した。

この表-1の結果から、Mortierella属の特定糸状菌は γ -リノレン酸含量が全脂質に対する場合でも23%以上であることが分る。

表 - 1 (培地 400 ml 培養日数

10日間での比較)

| 菌 株 名 | I F O No. | 培養温度 (℃) | 菌体生成量 D C(g) | 生成脂質 (mg) | × 1 | | | × 2 | | |
|------------------------------------|--------------|-------------|-----------------|--------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------|------|------|
| | | | | | 量 T L T L/D C(%) | 中性脂質 N L/D C(%) | 極性脂質 P L/D C(%) | γ-リノレン酸含量 | | |
| Mortierella vinacea | 6738 | 20 | 0.242 | 21.5 | 8.9 | 4.9 | 4.0 | 25.5 | 19.2 | 40.3 |
| | | 30 | 0.336 | 45.2 | 13.5 | 9.4 | 4.1 | 24.7 | 17.7 | 25.6 |
| ramanniana Var. anguli spora | 8187 | 20 | 0.359 | 83.9 | 23.4 | 11.3 | 12.1 | 31.5 | 28.2 | 35.9 |
| | | 30 | 0.201 | 52.9 | 26.3 | 17.1 | 9.2 | 23.7 | 20.3 | 30.6 |
| nana | 8794 | 30 | 0.614 | 126.6 | 20.6 | 12.7 | 7.9 | 28.2 | 20.3 | 32.8 |
| isabellina | 6739 | 20 | 0.699 | 139.1 | 19.9 | 11.6 | 8.3 | 25.2 | 19.3 | 33.4 |
| | | 20 | 0.721 | 136.4 | 18.9 | 12.7 | 6.2 | 32.5 | 24.9 | 38.3 |
| | | 30 | 0.954 | 188.9 | 19.8 | 12.5 | 7.3 | 25.6 | 23.7 | 27.4 |
| | | 30 | 0.648 | 112.0 | 17.3 | 10.3 | 7.0 | 25.0 | 19.0 | 28.5 |
| | | 20 | 0.577 | 100.9 | 17.5 | 10.8 | 6.7 | 25.2 | 20.9 | 30.4 |

 $\times 1$ NL $\times 2$ PI